

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Wolfgang Schmitz, Horst Müntefering und Christl Kordian

Die Lysosomen der Herzmuskelzelle im Ablauf
der EMC-Virus-Schädigung

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Schmitz

1978

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533910_0015

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Wolfgang Schmitz, Horst Müntefering und Christl Kordian

Die Lysosomen der Herzmuskelzelle im Ablauf
der EMC-Virus-Schädigung

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Schmitz

1978



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der Medizinischen
Fakultät der Universität
Düsseldorf

Referent

gez.: Prof. Dr.med. H. Müntefering

Korreferent

gez.: Prof. Dr.med. H. Reinauer

gez.: Prof. Dr.med. H. G. Goslar

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Einleitung	2
Material und Methoden	4
Ergebnisse	6
Diskussion	9
Abbildungen	13
Literaturverzeichnis	22
Lebenslauf	27

Zusammenfassung

Für die Untersuchung wurden insgesamt sechzig drei Wochen alte männliche N.M.R.I./Han. Mäuse mit je 0,25 ml einer 10^{-2} verdünnten EMC-Virus-Suspension* durch subcutane Injektion infiziert. Die Tiere wurden in vierstündigem Abstand bis hin zur 72. Stunde (moribundes Stadium) durch Dekapitation getötet und die noch schlagenden Herzen entnommen. Jeweils der linke Ventrikel wurde abpräpariert und für die elektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet. Die Viren wurden mit einer indirekten immunologischen Methode an einen Antikörper-Ferritin-Komplex gekoppelt, um sie so morphologisch sicher von freien Ribosomen unterscheiden zu können. Die Darstellung der Lysosomen erfolgte histochemisch über den Nachweis ihrer sauren Phosphatase.

Die Zell-Virus-Interaktion beginnt bereits in der vierten Stunde p. i.. Viruspartikel sind an die Zellmembran adsorbiert oder befinden sich bereits nach mikropinocytotischer Aufnahme im Cytoplasma der Zelle. In diesen Anteilen der Zelle sind neben einem Maschenwerk lamellärer Membranen auch Lysosomen zu sehen, die zum Teil Viruspartikel inkorporiert haben. Die Membranen dieser Lysosomen sind oft rupturiert, so daß die lysosomale saure Phosphatase ins Cytosol der Zelle ausfließen kann. Dieser Vorgang muß als ein den Zellschaden mitauslösendes Ereignis angesehen werden, denn die pathologischen Veränderungen sind ausschließlich auf die Anteile der Zelle beschränkt, in denen sich Viren befinden, also auf die peripheren Anteile der Zelle.

Die Veränderungen am Kern im Sinne einer Aufhellung und Margination des Chromatins sind ohne direkte

* Herz einer moribunden weißen Maus suspendiert in 1 ml Earls Medium.

Beteiligung von Lysosomen zustande gekommen.

Die um die 28. Stunde p.i. beobachtete Prominenz des Golgi-Feldes geht mit einer gesteigerten autophagischen Aktivität einher. Von den Golgi-Cisternen schnüren sich mehr und mehr phosphataseaktive Vesikel ab, die als Lysosomen zu interpretieren sind. In der weiteren Entwicklung der Schädigung kommt es zu einer massiven Proliferation der Lysosomenfraktion. Die Mitochondrien werden in gesteigertem Maß abgebaut, und es kommt zur autophagischen Kompartimentierung ganzer Cytoplasmaanteile. Die Zelle zeigt eine vollständige Auflösung ihrer Strukturen und oftmals eine Zerstörung der Zellmembran, die den neu synthetisierten Viren ermöglicht, die Zelle zu verlassen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß für die Pathogenese des virusinduzierten Myokardzellschadens den Lysosomen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Der für die Picornaviren typische cytopathische Effekt scheint über eine Aktivierung dieser Organellen ausgelöst zu werden.

Einleitung

Das Enzephalomyokarditis- (EMC) - Virus kann in jeder Hinsicht als ein typischer Vertreter der Picornaviren gelten (MELNICK et al., 1963). Es ist identisch mit dem Columbia-SK-Virus, dem Mengo-Virus und dem Parapoliomyelitis-Virus. Mit seiner geringen Größe von 25 - 27 nm, dem Gehalt einer einsträngigen RNA, einem isometrischen Kapsid, das nur aus Proteinen aufgebaut ist, und einer fehlenden Envelope besitzt es die gemeinsamen Merkmale der Picornaviren. Wegen der relativ leichten Züchtbarkeit und der identischen Antigenität der verschiedenen Stämme bietet sich dieses Virus als Modell für die experimentelle Forschung an (STARKE und HLINAK. 1974 a; WIESMANN, 1974).

In der Myokardzelle der weißen Maus löst das EMC-Virus bereits in der Frühphase der Infektion

den für die Picornaviren typischen cytopathischen Effekt aus im Sinne einer Chromatinumverteilung im Kern und charakteristischer Veränderungen im Cytoplasma (BURCH et al., 1971; HARB und BURCH, 1973). Dazu zählt insbesondere eine starke Zunahme lysosomaler Elemente (MEESSEN et al., 1975). Diesen Organellen wurde eine maßgebliche Rolle bei der Zell-Virus-Interaktion zugeschrieben (ALLISON und SANDELIN, 1963; WOLFF und BUBEL, 1964).

Nach Inokulation von Vaccinia-, Adeno- und REO-Viren wurde das Verhalten der Lysosomen von Kulturzellen beim Prozess des uncoating und bei der Freisetzung der viralen Nukleinsäure beschrieben (DALES und KAJIOKA, 1964; DALES et al., 1965; SILVERSTEIN und DALES, 1968; CHARDONNET und DALES, 1970; SILVERSTEIN et al., 1973). In der vorliegenden Untersuchung wird festgestellt, inwieweit diese Beobachtungen auch für das EMC-Virus zutreffen. Ferner wird zur Frage der Beteiligung von Lysosomen an autophagischen Prozessen und zur Frage ihres Einflusses auf den cytopathischen Effekt Stellung genommen.

Durch Markierung der Viren mit einem Antikörper-Ferritin-Konjugat und den Nachweis der lysosomalen sauren Phosphatase wird die Beteiligung dieser Organellen an der Zell-Virus-Interaktion in vierstündigem Abstand während des Ablaufs der Schädigung bis zum Erreichen des moribunden Stadiums untersucht. Im Verlauf der auftretenden pathologischen Zellveränderungen erscheint die Lysosomenfraktion in einem heteromorphen Zustand. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird versucht, diesen morphologischen Befunden eine funktionelle Bedeutung zuzuordnen.

Material und Methoden

Für das Enzephalomyokarditis- (EMC) - Virus sind zwei Varianten bekannt, von denen der "E-Typ" eine besondere Affinität zum Gehirn und zum exokrinen Parenchym des Pankreas aufweist (CRAIGHEAD, 1966). Bei den Versuchen wurde die M-Variante des EMC-Virus verwendet, die sich neben einer selektiven Pathogenität für den Inselapparat des Pankreas durch eine ausgeprägte Kardiotropie auszeichnet (MÜNTEFERING, 1972). Dieses Virus wurde durch Herzpassagen an der weißen Maus optimal an die Myokardzelle adaptiert, so daß bei mittlerer Dosierung bei jedem infizierten Tier eine Affektion des Herzmuskels eintrat. Die Gesamtheit der Versuchstiere bestand aus 60 drei Wochen alten männlichen N.M.R.I./Han.-Mäusen. Diese wurden durch subcutane Injektion einer 10^{-2} verdünnten EMC-Virus-Suspension infiziert und in Gruppen von 3 - 4 Tieren in vierstündigem Abstand bis hin zur 72. Stunde (moribundes Stadium) durch Dekapitation getötet und die noch schlagenden Herzen entnommen. Jeweils der linke Ventrikel der Herzen wurde dann zur weiteren Behandlung abpräpariert. In jeder untersuchten Infektionsphase wurde ein nicht infiziertes Kontrolltier mitgeführt und ebenso behandelt. Für die Elektronenmikroskopie wurde das Gewebe in ca. 1 mm^3 große Stückchen zerschnitten und in einer Glutaraldehyd-Formalin-Mischung eine Stunde bei 4°C vorfixiert und anschließend mindestens 24 Stunden in einem 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer, der mit Saccharose stabilisiert war, bei pH 7,2 gewaschen.

Histochemische Technik

Die Darstellung der lysosomalen sauren Phosphatase erfolgte nach dem Prinzip der von GOMORI (1952) beschriebenen Bleiphosphat-Methode und einer

technischen Modifikation nach ERICSSON und TRUMP (1965) sowie BECK et al. (1971). Das Inkubationsmedium wurde für jede Versuchsreihe neu angesetzt und vor Anwendung auf einen pH von 5,2 eingestellt. Die Inkubationszeit für die Gewebestückchen betrug jeweils 90 Minuten bei 37°C. Von einigen Teilen der Gewebeproben wurden vor Inkubation 40 µ dicke Gefrierschnitte angefertigt, in einen Na-Cacodylat-Puffer überführt und für 30 Minuten bei 4°C gewaschen. Anschließend erfolgte die histochemische Reaktion bei Varrierung der Inkubationszeit zwischen 15 und 60 Minuten. Diese Gefrierschnitte und die für 90 Minuten inkubierten Gewebestückchen wurden nach dreimaligem Waschen in einem 0,1 M Na-Cacodylat-Puffer mit Osmiumtetroxyd für 2 Stunden bei 4°C nachfixiert und anschließend für 25 Minuten in Aqua dest. gespült. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in Araldit, wobei die Gefrierschnitte in einer modifizierten Flachbett-einbettung so präpariert wurden, daß großflächige Ultradünnschnitte hergestellt werden konnten.

Virusmarkierung

Das Virusantigen wurde mit einer indirekten immunologischen Methode an Ferritin gekoppelt. Nach Vorfixierung und mehrmaligem Waschen wurden die Gewebestückchen 1 Stunde in einem 1 : 5 verdünnten Rabbit Anti-EMC-Serum bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte zweimaliges Spülen in Coons-Puffer, pH 7,2, für jeweils 10 Minuten und erneute Inkubation in einer 1 : 5 verdünnten Anti-Rabbit-IgG-Ferritin-Konjugat-Lösung (Ferritin conjugated IgG fraction coat Anti-rabbit-IgG (heavy chain) Kit Lot 8343, Cappel laboratories, inc. Downingtown, PA. 19335, USA) für 1 Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer. Nach mehrmaligem Waschen in Coons-Puffer wurde nachfixiert, dehydriert

und eingebettet.

An mehreren Gewebeproben aus verschiedenen Infektionsstadien wurden die Phosphatasereaktion und die Virusmarkierung durchgeführt. Dabei erfolgte nach Vorfixierung und Waschen zunächst die saure-Phosphatase-Reaktion und nach dreimaligem Waschen die immunologische Reaktion der Virusantigene mit dem Ferritin-Konjugat. Postfixierung, Dehydrierung und Einbettung in Araldit M 12 wurden in üblicher Weise durchgeführt.

Elektronenmikroskopie

Die mit den oben beschriebenen Methoden behandelten Gewebeproben wurden an einem "Reichert-Ultramikrotom" ultradünneschnitten. Ein Teil dieser Schnitte wurde mit Uranylacetat und Bleizitrat nachkontrastiert. Der andere Teil wurde ohne Nachkontrastierung beurteilt, um eine Verwechslung des Bleiniederschlags der Kontrastierung mit dem Phosphatase-Reaktionsprodukt zu vermeiden. Diese Schnitte konnten somit als Kontrollbefunde ausgewertet werden. Die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte an einem "Siemens Elmiskop 101".

Ergebnisse

Bereits vier Stunden nach der subcutanen Virusinokulation sind Viruspartikel an der Zelloberfläche zu sehen. Sie sind an die Zellmembran adsorbiert. Ein Teil der Viren befindet sich nach mikropinocytotischer Aufnahme bereits intrazellulär (Abb. 1). Eine direkte Penetration der Zellmembran wurde nicht beobachtet.

Die Viren befinden sich nicht nur in der Myokardzelle selbst, sondern die Zellen des Interstitiums sind in gleicher Weise von den penetrierenden Viren befallen (Abb. 2). In der Umgebung dieser eingebrungenen Viren ist das Cytoplasma der Zelle von lamellären Membranen durchzogen. Aus diesem Maschen-

werk schnüren sich Vakuolen ab, die sowohl von Einzel- als auch von Mehrfachmembranen begrenzt sind (Abb. 3). Zum Teil zeigen sie saure-Phosphatase-Aktivität und sind somit als Lysosomen anzusehen. Einige von ihnen sind Heterolysosomen, die Viruspartikel inkorporiert haben (Abb. 2, 81). Zu diesem Zeitpunkt sind die Veränderungen ausschließlich auf die Anteile der Zelle beschränkt, in denen sich Viren befinden, also auf die peripheren Anteile des Cytoplasmas.

Zur gleichen Zeit, also ebenfalls in einer frühen Phase der EMC-Virus-Schädigung, zeigen sich Veränderungen am Kern. Das Chromatin ist aufgehellt und in die Kernperipherie verlagert. Der perinukleäre Raum erscheint erweitert (Abb. 4 a). Eine Beteiligung von Lysosomen an diesen pathologischen Vorgängen ist nicht beobachtet worden. All diese Veränderungen spielen sich bereits bis zur vierten Stunde nach Virusinokulation ab und nehmen in ihrer Intensität im weiteren Verlauf der virusbedingten Zellschädigung zu.

Um die 28. Stunde nach Infektion wird zum ersten Mal eine Prominenz des Golgi-Feldes beobachtet. Es unterscheidet sich deutlich von den Befunden an Kontrolltieren. In seiner Nähe erscheinen mehr und mehr multiple Vesikel, die sich offensichtlich von den Golgi-Cisternen abgeschnürt haben. In einem Teil von ihnen konnte saure-Phosphatase-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 4 b). Auch komplette primäre Lysosomen sind in diesem Bereich des Cytoplasmas zu sehen.

Gleichzeitig mit der Prominenz dieser Organellen in der Nähe des Kerns kommt es in anderen Bereichen der Zelle zur Kompartimentierung von Cytoplasmaanteilen. An diesen Vorgängen sind autophagische Lysosomen beteiligt. Mitochondrien werden in einem Ausmaß abgebaut, das den normalen turn-over bei weitem übersteigt. Dabei lagern sich primäre Lysosomen an ihre äußere

Membran an und geben ihre saure Phosphatase in die Matrix der Mitochondrien ab. In der Folge kommt es zur Auflösung der cristae-Strukturen und zu einer Verdichtung der gesamten Matrix. Die Membranen lösen sich auf. Der Rest erscheint als "residual material". Außerdem sind sekundäre Lysosomen zu beobachten, die ganze Mitochondrien, mit mehr oder weniger erhaltenen cristae-Strukturen, eingeschlossen haben (Abb. 5, 8 j).

Diese beiden Erscheinungsformen autophagischer Prozesse werden auch beim Abbau degenerativer Lipoidtropfen, die schon relativ früh und während des gesamten Ablaufs der virusbedingten Zellschädigung nachweisbar sind, beobachtet. Dabei können Fettropfen einmal durch primäre Lysosomen abgebaut werden, indem sie von einem Saum saurer Phosphatase umschlossen werden. (Abb. 6, 8 g), oder aber sie sind als Einschlüsse in autophagischen Lysosomen zu finden.

Um die 34. Stunde nach Virusinokulation ist eine massive Proliferation der Lysosomenfraktion zu erkennen, die mit einer Aktivierung der lysosomalen sauren Phosphatase einhergeht. Die Membranpermeabilität der Organellen scheint erhöht zu sein; zum Teil sind die Membranen rupturiert, so daß die Phosphatase in das Cytosol der Zelle ausströmen kann (Abb. 8 d). In diesen Bereichen ist die Zellstruktur hochgradig aufgelöst. (Abb. 7). Es sind kaum noch intakte Mitochondrien zu sehen; die Menge der Lipoidtropfen hat zugenommen; die Muskelfibrillen sind desintegriert. Fragmente dieser Fibrillen sind jedoch nicht intralysosomal zu sehen. Neben den schon beschriebenen Veränderungen am Kern sind nun auch buchtige Verformungen der Kernmembran festzustellen. Jedoch wird auch hierbei ein direkter Einfluß von Lysosomen nicht beobachtet.

Neben noch erhaltenen Zellen zeigen zu diesem Zeitpunkt bereits viele eine vollständige Desintegration ihrer cytoplasmatischen Anteile und eine Zerstörung

der Zellmembran. Im Finalstadium kommt es zur Pyknose und zum Kernzerfall.

Diskussion

Die Gruppe der Picornaviren zeichnet sich durch einen ausgeprägten cytopathischen Effekt aus, der mit einer starken Zunahme lysosomaler Elemente einhergeht. In der vorliegenden Arbeit werden die Lysosomen der Herzmuskelzelle nach Inokulation von EMC-Viren sowohl hinsichtlich ihrer Beteiligung an hetero- und autophagischen Prozessen als auch hinsichtlich ihres Einflusses auf den cytopathischen Effekt untersucht.

Bereits in der Frühphase der Zell-Virus-Interaktion kommt es in der Umgebung der eingedrungenen Viren zur Ausbildung eines Maschenwerks lamellärer Membranen, das diese Bereiche des Cytoplasmas durchzieht. Zum Teil haben die phosphataseaktiven Lysosomen Viruspartikel inkorporiert, zum Teil aber sind ihre Membranen rupturiert und ihre Phosphatase befindet sich frei im Cytosol der Zelle. Die Veränderungen am Kern sind offensichtlich ohne den direkten Einfluß der Lysosomen aufgetreten. Im weiteren Verlauf der virusbedingten Schädigung kommt es zu einer Aktivierung des Golgi-Feldes. Autophagische Kompartimentierung von Zellorganellen oder größerer Cytoplasmaanteile und schließlich eine massive Proliferation der Lysosomenfraktion führen zur vollständigen Auflösung der Zelle.

Der für die Aufnahme von Viren in die Zelle beschriebene mikropinocytotische Mechanismus (DALES, 1969, 1973) wird auch bei der Einschleusung von EMC-Viren in die Myokardzelle beobachtet. Eine bei der Beobachtung von Polioviren beschriebene direkte Penetration der Zellmembran (DUNNEBACKE et al., 1969) wurde nicht gesehen.

Für eine Virusvermehrung ist die Freisetzung der viralen Nukleinsäure notwendig. Am Beispiel der REO-Viren zeigten SILVERSTEIN et al. (1972), daß das uncoating der äußeren Schichten des viralen Kapsids intralysosomal erfolgt. Anschließend gelangt der virale RNA-Doppelstrang zusammen mit einigen Kapsidproteinen in das Cytosol der Zelle. Die intralysosomal gefundenen Viruspartikel lassen für das uncoating des EMC-Virus einen ähnlichen Mechanismus vermuten. Diese Beobachtungen werfen dann die Frage auf, ob und inwieweit die freigesetzte virale RNA gegen lysosomale oder cytoplasmatische Nukleasen geschützt ist. Viel ist über das intralysosomale Milieu (pH, Ionen, Inhibitoren etc.), das eine erfolgreiche Digestion möglich macht, bis heute nicht bekannt. (HOLTZMAN, 1976 a, b). Es erscheint aber als schlüssig, daß die lysosomalen Enzyme als Proenzyme oder, allgemein gesagt, in einer inaktiven Form vorliegen. Wäre dies nicht der Fall, müßten beispielsweise intralysosomale Proteasen ihre eigenen Organellenmembranen von innen herausabbauen. Die gemachten Beobachtungen, daß in der Frühphase der Infektion die Schädigung gerade auf die Anteile des Cytoplasmas beschränkt ist, in denen Viren und rupturierte Lysosomen mit ausfließenden Enzymen gefunden werden, legen den Schluß nahe, daß es gerade der Effekt der Viren war, durch eine Aktivierung der lysosomalen Enzyme einerseits ihr uncoating einzuleiten und andererseits durch den funktionellen Zusammenbruch der Lysosomen, also ihrer Membranschädigung, den cytopathischen Effekt einzuleiten. Die Ruptur der Lysosomenmembranen und das Ausströmen der Enzyme ist also nicht eine Reaktion auf einen bereits bestehenden Zellschaden, sondern als ein den Zellschaden mitauslösendes Ereignis anzusehen. Die Ergebnisse von biochemischen Untersuchungen an Zellhomogenisaten unterstreichen, daß die Freisetzung

lysosomaler Enzyme bei der Auslösung des cytopathischen Effekts entscheidend beteiligt ist (ALLISON and SANDELIN, 1963).

In dieser Frühphase der Zellschädigung hat eine Virusvermehrung noch nicht stattgefunden (MEESSEN et al., 1975) und kann somit als pathogenetischer Mechanismus ausgeschlossen werden.

Unmittelbar nach der Freisetzung der viralen RNA kommt es zur Ausbildung von Proteinen (early proteins), die zu einer Hemmung der zellulären Protein- und RNA-Synthese führen. Eine vorherige Replikation der viralen RNA ist für diese Leistung nicht erforderlich. Der sich dann anschließende Replikationszyklus der Viren läuft über einen intermediär aufgebauten RNA-Doppelstrang ab, der, im Gegensatz zum Einzelstrang des viralen Genoms, gegen Ribonukleasen geschützt ist (STARKE und HLINAK, 1974 b).

Dieser bereits früh einsetzende Hemmechanismus scheint die zellulären Abwehrleistungen stark zu unterdrücken. Im weiteren Ablauf der Zellschädigung kommt es trotz der Umstellung des zellulären Stoffwechsels auf die Virusneusynthese zu einer gesteigerten Bildung von neuen Lysosomen (KOSCHEL, 1969). Bei Applikation von Proteinsynthesehemmern an nicht infizierten Makrophagen wurde keine Lysosomenproliferation beobachtet (COHN und FEDORKO, 1969). Möglicherweise ist die Proliferation neuer Lysosomen ein virusgesteuerter Vorgang (AMAKO und DALES, 1967). Bei diesen Beobachtungen wird in Übereinstimmung mit anderen Autoren (z.B. NOVIKOFF, 1961) der Hauptbildungsort der neuen Organellen am Golgi-Apparat lokalisiert.

Die Lysosomen reagieren auf eine Reihe metabolischer Veränderungen und sind ganz besonders reagibel in einem sauren Milieu (de DUVE, 1957). Infolge des starken Verlustes an funktionell erhaltenen Mitochondrien kommt es durch den veränderten O_2 -Stoffwechsel zu metabolischen Veränderungen, die den bereits physiolo-

gischerweise relativ niedrigen pH der Herzmuskelzelle weiter senken. Auch durch diese Vorgänge kommt es zu Veränderungen in der Stabilität lysosomaler Membranen, die ein Freisetzen der Enzyme ins Cytoplasma begünstigen und zum Fortschreiten der Zellschädigung führen (RICCIUTTI, 1972 a, b). Die Beobachtungen über die Formation autophagischer Lysosomen im späten Stadium der Schädigung entsprechen den an anderen Zellen gemachten Befunden (ERICSSON und TRUMP, 1964). Diese Autolysosomen haben Organellen und ganze Zellanteile segregiert. Ihr Auftreten steht ebenfalls in einer Beziehung zur virusinduzierten Schädigung (RUEBNER et al., 1966), denn sie haben in Anzahl und Aktivität gegenüber den beim normalen Zell-turn-over beobachteten Autolysosomen zugenommen. Diese Reaktion ist jedoch generell als Anpassung zu interpretieren, die den Zellstoffwechsel aufrechterhalten soll. Zu diskutieren wäre die Möglichkeit, ob die durch Degradation abgespaltenen niedermolekularen Bruchstücke für die Virusneusynthese utilized werden können. Die Pathogenese der virusinduzierten Schädigung der Myokardzelle wird von vielen Faktoren beeinflusst. Einer dieser ist die Rolle der Lysosomen, der eine entscheidende Bedeutung zukommt.



Abb. 1: Viruspartikel sind an die Zelloberfläche adsorbiert, 4 Stunden nach der subcutanen Inokulation von EMC-Viren. Pathologische Veränderungen sind zu diesem Zeitpunkt der Infektion nicht sichtbar.

X 7200. Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase und Virusmarkierung mit Ferritin.

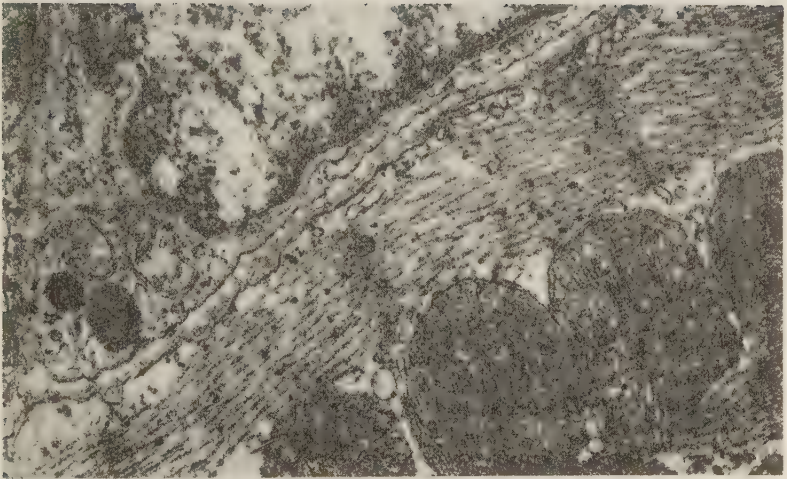


Abb. 2: Mikropinocytotische Vakuolen und bereits eingeschleuste Viren in der Nähe der Zellmembran; Myokardzelle (unten) und eine interstitielle Zelle (oben). Links im Bild Heterolysosomen mit inkorporierten Viruspartikeln. X 33600. Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase und Virusmarkierung mit Ferritin.

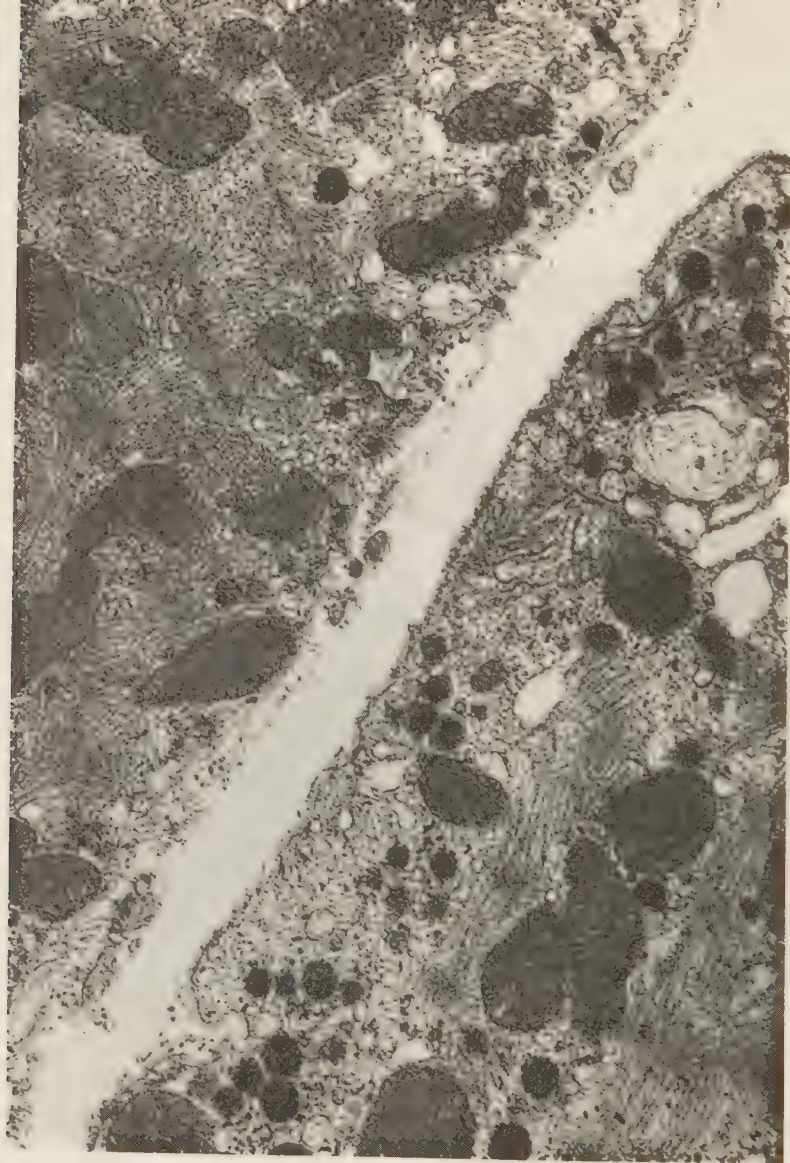


Abb. 3: Erste pathologische Veränderungen 4 Stunden nach der subcutanen Inokulation von EMC-Viren. Es sind vermehrt lysosomale Elemente in der Nähe der Zellmembran sichtbar. X 13200. Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase.



Abb. 3: Erste pathologische Veränderungen
4 Stunden nach der subcutanen Inokulation
von EMC-Viren. Lysosomale Auflösung der
Viren mit gleichzeitiger Zellschädigung
in diesem Gebiet. X 13200.
Histochemische Reaktion der lysosomalen
sauren Phosphatase und Virusmarkierung
mit Ferritin.

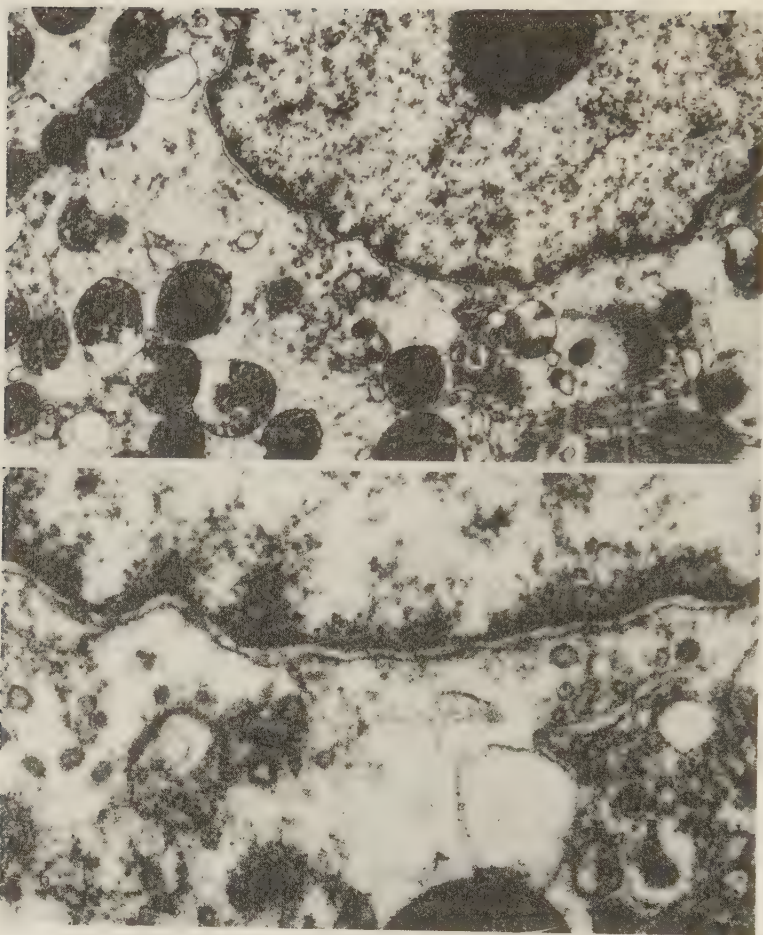


Abb. 4: Myokardzelle 28 Stunden nach subcutaner Inokulation von EMC-Viren. Kern mit peripherer Kondensation des Chromatins und Erweiterung des perinukleären Raumes (a); das Golgi-Feld tritt deutlich hervor (b). X 13200 (a); X 43560 (b).

Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase.

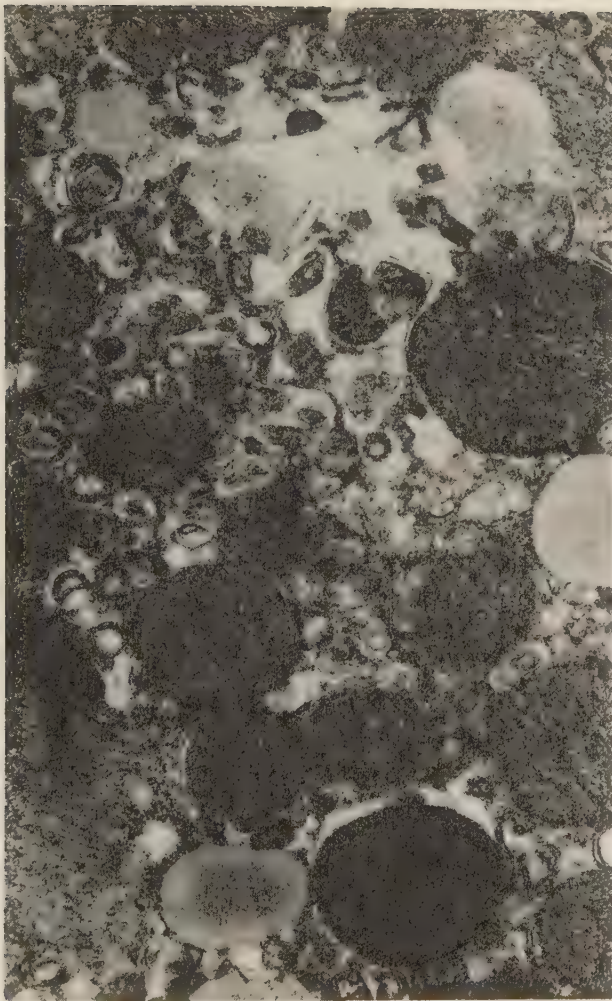


Abb. 5: Myokardzelle der weißen Maus 30 Stunden nach subcutaner Inokulation von EMC-Viren. Anhäufung lysosomaler Elemente mit partieller Auflösung des Cytoplasmas (oben) und lysosomale Degradation eines Mitochondriums mit verschwommenen Cristae-Konturen und einer verdichteten Matrix (unten).
X 11800.

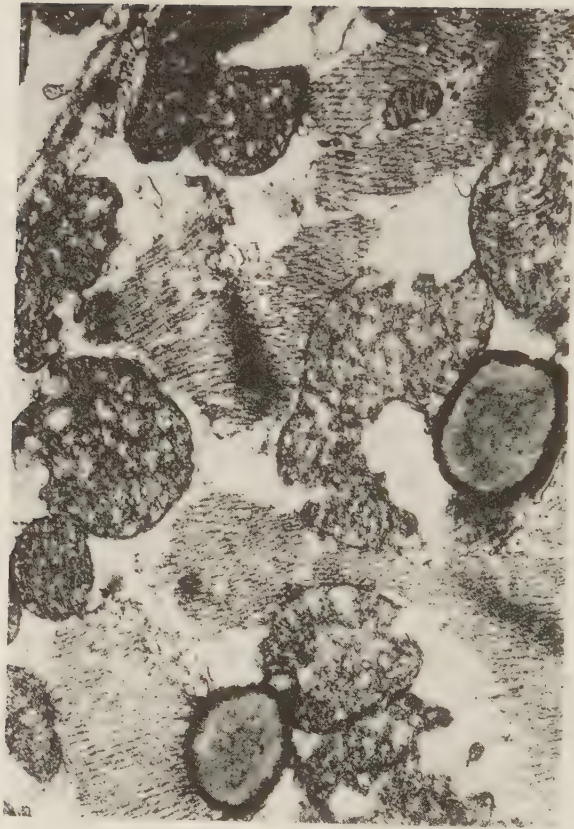


Abb. 6: Myokardzelle der weißen Maus
72 Stunden nach subcutaner Inokulation
von EMC-Viren. Zwei degenerative
Fetttropfen in einer stark geschädigten
Zelle, eingeschlossen von einem Saum
saurer Phosphatase. X 26400.
Histochemische Reaktion der lysosomalen
sauren Phosphatase.

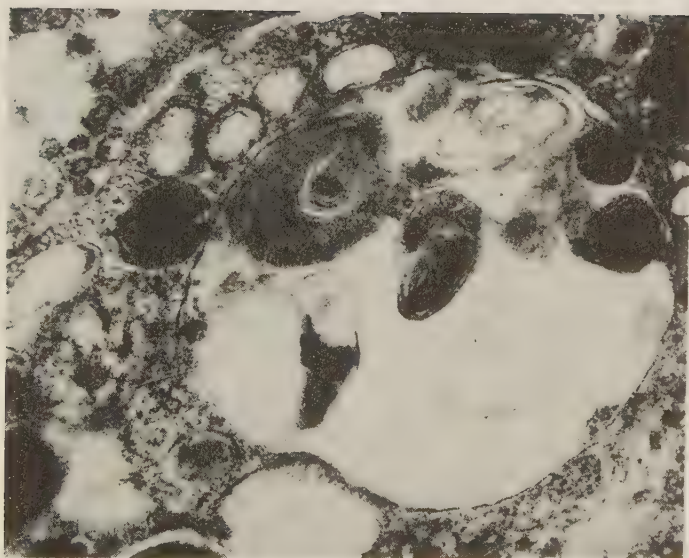
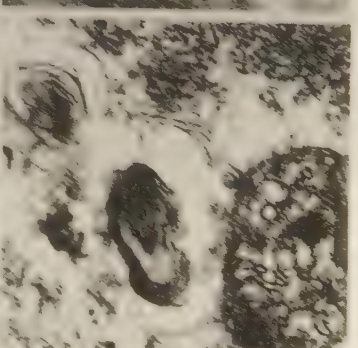
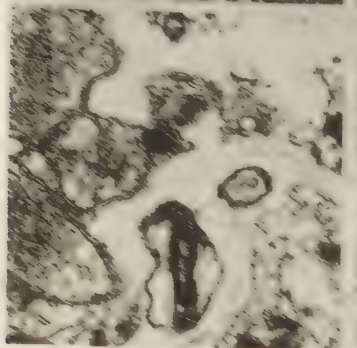
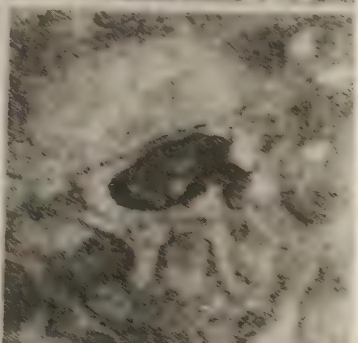
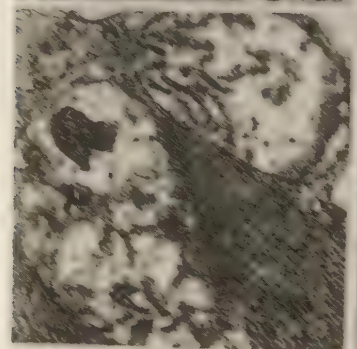
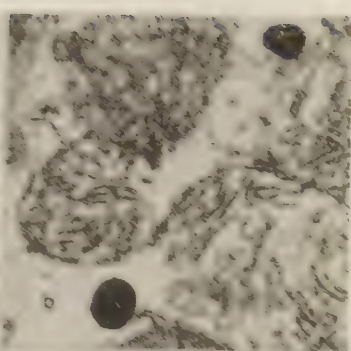
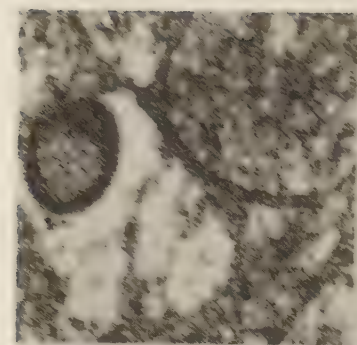


Abb. 7: Fortgeschrittener Myokardzellschaden 72 Stunden nach subcutaner Inokulation von EMC-Viren. Autophagische Segregation des Cytoplasmas, begleitet von einer gesteigerten sauren-Phosphatase-Aktivität. X 48000. Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase.



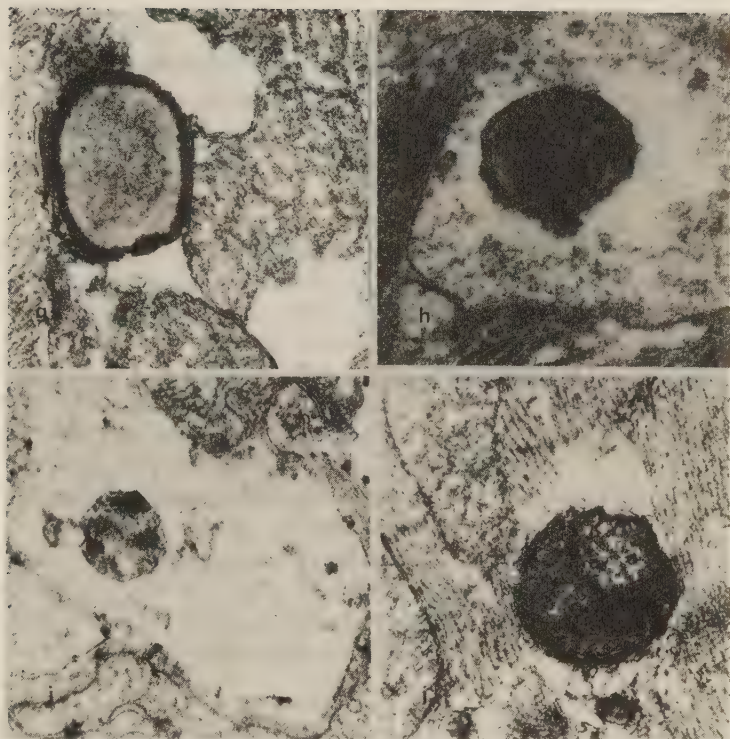


Abb. 8: Verschiedene Typen von Lysosomen, die im Ablauf der EMC-Virus-Schädigung der Herzmuskelzelle beobachtet wurden. X 48000. Histochemische Reaktion der lysosomalen sauren Phosphatase, in i. zusätzlich Virusmarkierung mit Ferritin.

a. und b.: Verschiedene primäre Lysosomen.

c. und d.: Primäre Lysosomen mit Ruptur ihrer Membranen und Freisetzung ihrer Hydrolasen; in c. die sehr seltene intramitochondriale Position.

e. und f.: Telolysosomen mit myelinartigen Membranen in einer geschädigten Zelle.

g.: Lysosomale saure Phosphatase schließt einen Fetttropfen ein.

h.: Lamellärer Typ eines autophagischen Lysosoms.

i.: Heterolysosom mit inkorporierten Virusaggregaten.

j.: Phagolysosom mit eingeschlossenen mitochondrialen Strukturen.

Literaturverzeichnis

Allison, B.M. and Sandelin, K.: Activation of lysosomal enzymes in virus-infected cells and its possible relationship to cytopathic effects.

J. Exptl. Med. 117, 879-889 (1963)

Amako, K., and Dales, S.: Cytopathology of Mengovirus infection.

I. Relationship between cellular disintegration and virulence. Virology 32, 184-200 (1967)

II. Proliferation of membranous cisternae. Virology 32, 202-215 (1967)

Beck, F., Lloyd, and Parry L.M.: The study of endocytosis and lysosome function in embryotrophic nutrition. Methods in mammalian embryology.

Joseph C. Daniels, pp. 378-418.

W.H. Freeman and Company, San Francisco (1971)

Burch, G.E., Harb, J.M. Colcolough, H.L., and Tsui C.Y.: Encephalomyocarditis infection of the newborn mouse myocardium. Arch. of Intern. Med. 127, 148-156 (1971)

Chardonnet, Y., and Dales, S.: Early events in the interaction of adenovirus with Hela cells.

I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. Virology 40, 462-477 (1970)

II. Comparative observations on the penetration of types 1, 5, 7, and 12. Virology 40, 478-485 (1970)

Cohn, Z.A., and Fedorko, M.E.: The formation and fate of lysosomes. In: Lysosomes in biology and pathology, Dingle, J.T., and Fell, H.B. (editors), Vol. 1, pp. 43-63, North-Holland Publishing Company, Amsterdam - London (1969)

Craighead, J.E.: Pathogenicity of the M and E variants of the enccephalomyocarditis (EMC) virus.

I. Myocardiotropic and neurotropic properties.

Amer. J. Path. 48, 333-345 (1966)

II. Lesions of the pancreas, parotid and lacrimal glands. Amer. J. Path. 48, 375-386 (1966)

Dales, S.: Early events in cell-animal virus interactions. Bact. Rev. 37, 103-135 (1973)

Dales, S.: Role of lysosomes in cell-virus interactions. In: Lysosomes in biology and pathology,

Dingle, J.T., and Fell, H.B. (editors), Vol. 2, pp. 69-86, North-Holland Publishing Company,

Amsterdam - London (1969)

Dales, S., and Kajioaka, R.: The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's stain L cells:

I. Uptake and penetration. Virology 24, 278-294 (1964)

Dales, S., Gomatos, P.J., and Hsu, K.C.: The uptake and development of reo-virus in strain L cells followed with labeled viral ribonucleic acid and ferritin-antibody conjugates. Virology 25, 193-211 (1965)

Duve, C. De: Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. Subcellular particles, Hayashi, T. (editor), pp. 128-159, Ronald Press, New York (1959)

Dunnebacke, T.H., Leventhal, J.D., and Williams, R.C.: Entry and release of poliovirus as observed by electron microscopy of cultured cells. J. Virol. 4, 505-513 (1969)

Ericsson, J.L.E., and Trump, B.F.: Observations on the application to electron microscopy of the lead phosphatase technique for the demonstration of acid phosphatase. Histochemie 4, 470-487 (1965)

- Ericsson, J.L.E., and Trump, B.F.: Electron microscopic studies of the epithelium of the proximal tubule of the rat kidney. I. The intracellular localisation of acid phosphatase. Lab. Invest. 13, 1427-1456 (1964)
- Gomori, G.: Acid phosphatase. In: Microscopic histochemistry. Principles and practice. By Gomori, G., pp. 189-194, The University of Chicago Press, Chicago (1952)
- Harb, J.M., and Burch, G.E.: Ultrastructural cytopathology of mouse myocardium associates with EMC viral infection. J. Mol. Cell. Cardiol. 5, 55-62 (1973)
- Holtzman, E.: The lysosomal enzymes. In: Lysosomes: A Survey. Cell Biology Monographs, Alfert, M., Beermann, W., Rudkin, G., Sandritter, W., and Sitte, P. (editors), Vol. 3, pp. 8-11, Springer-Verlag, Wien - New York (1976 a)
- Holtzman, E.: Digestion in lysosomes. In: Lysosomes: A Survey. Cell Biology Monographs, Alfert, M., Beermann, W., Rudkin, G., Sandritter, W., and Sitte, P. (editors), Vol. 3, pp. 11-13, Springer-Verlag, Wien - New York (1976 b)
- Koschel, K.: Molekularbiologie der Poliovirus-Infektion. Umschau in Forschung und Technik, 13, 404-412 (1969)
- Meessen, H., Müntefering, H., Schmidt, W.A.K., Müller-Ruchholtz, E.R., and Kieker, W.-R.: Virus-induced damage of the myocardial cell. Recent. Adv. Stud. Cardiac. Struct. Metab., Vol. 6, 525-533 (1975)

Melnick, J.L., Cockburn, W.C., Dalldorf, G.,
Gard, S., Gear, J.H.S., Hammon, W.M., Kaplan, M.M.,
Nagler, F.P., Oker-Blom, N., Rhodes, A.J.,
Sabin, A.B., Verlinde, S.D., v. Magnus, H.:
Picornavirus group. Virology 19, 114-116 (1963)

Müntefering, H.: Zur Pathologie des Diabetes mellitus
der weißen Maus bei der EMC-Virusinfektion.
Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. 356, 207-234
(1972)

Novikoff, A.B.: Lysosomes and related particles.
In: The cell. Brachet, J., and Mirsky, A.E. (editors),
Vol. 2, pp. 423-488, Academic Press New York (1961)

Ricciutti, M.A.: Myocardial lysosome stability in
the early stages of acute ischemic injury.
Am. J. Cardiol., Vol. 30, 492-497 (1972 a)

Ricciutti, M.A.: Lysosomes and myocardial cellular
injury. Am. J. Cardiol., Vol. 30, 498-502 (1972 b)

Ruebner, B.H., Hirano, T., Slusser, R., Osborn, J.,
Medearis, N., Jr.: Cytomegalovirus infection. Viral
ultrastructure with particular reference to the
relationship of lysosomes to cytoplasmic inclusions.
Amer. J. Path. 48, 971-990 (1966)

Silverstein, S.C., Astell, C., Levin, D.H.,
Schonberg, M., and Acs, G.: The role of lysosomes
in the uncoating and activation of the reovirus
genome. Adv. Biosciences 11, 1-16 (1973)

Silverstein, S.C., Astell, C., Levin, D.H.,
Schonberg, M., and Acs, G.: The mechanism of reovirus
uncoating and gene activation in vivo. *Virology* 47,
797-809 (1972)

Silverstein, S.C., and Dales, S.: The penetration
of reovirus RNA and initiation of its genetic
function in L-strain fibroblasts. *J. Cell Biol.* 36,
197-230 (1968)

Starke, G. und Hlinak, P.: RNS-haltige Viren -
Picornaviren. In: *Grundriß der Allgemeinen*
Virologie. By Starke, G. und Hlinak, P., pp. 250-262
Gustav-Fischer-Verlag, Jena (1974 a)

Starke, G. und Hlinak, P.: Replikationsphasen der
RNS-Viren. In: *Grundriß der Allgemeinen Virologie*.
By Starke, G. und Hlinak, P., pp. 73-77, Gustav-
-Fischer-Verlag, Jena (1974 b)

Wiesmann, E.: Enzephalomyokarditisvirus.
In: *Medizinische Mikrobiologie*. By Wiesmann, E.,
pp. 273-274, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

Wolff, D.A., and Bubel, H.C.: The disposition of
lysosomal enzymes as related to specific viral
cytopathic effects. *Virology* 24, 502-505 (1964)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. H. Müntefering für die Überlassung des Themas und für seine hilfreiche Mitarbeit bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken. Mein Dank gilt ebenfalls der Mitautorin Frau Dr. Ch. Kordian für ihre Unterstützung bei den Versuchen.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 17. Januar 1951 als Sohn des Beamten Johann Bernhard Schmitz und seiner Ehefrau Helene Schmitz, geb. Krus, in 5144 Wegberg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Erkelenz und Rheydt wechselte ich 1962 zum Städtischen Gymnasium Rheydt-Odenkirchen, einem neusprachlichen Gymnasium mit altsprachlichem Zweig, und bestand dort am 4. Juni 1970 das Abitur.

Anschließend absolvierte ich den Wehrdienst.

Im Wintersemester 1972 begann ich mein Medizinstudium nach den Regelungen der neuen Approbationsordnung in Düsseldorf, bestand dort im Sommer 1974 die Ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den Ersten Abschnitt und mit Urkunde vom 15. September 1977 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Zur Zeit arbeite ich als Internatsstudent im Praktischen Jahr an der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Düsseldorf.

Düsseldorf, den 3. Mai 1978

Johann Schmitz

